

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. Mai 2003 (08.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2003/038437 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/68**, C12Q 1/68, A61K 38/00, 48/00, A01K 67/027

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2002/004063

(22) Internationales Anmeldedatum:
29. Oktober 2002 (29.10.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 53 335.7 29. Oktober 2001 (29.10.2001) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): MEDINNOVA GESELLSCHAFT FÜR MEDIZINISCHE INNOVATIONEN AUS AKADEMISCHER FORSCHUNG MBH [DE/DE]; Biegenstrasse 4, 35037 Würzburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): SENDTNER, Michael, Anton [DE/DE]; Helen-Keller-Str. 24, 97209 Veitshöchheim (DE). GUNNERSEN, Jennifer [AU/AU]; 82 Garton Street, Carlton North, VIC 3054 (AU). SEDLACEK, Hans-Harald [DE/DE]; Sonnenhang 3, 35041 Marburg (DE). WIESE, Stefan [DE/DE]; Egloffsteinstrasse 2, 97072 Würzburg (DE).

(74) Anwälte: JUNGBLUT, Bernhard usw.; Albrecht, Lüke & Jungblut, Gelfertstrasse 56, 14195 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:

5. Februar 2004

Zur Erklärung der Zwei-Buchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 2003/038437 A3

(54) **Title:** SCREENING METHOD FOR ACTIVE AGENTS WHICH INFLUENCE NERVE CELLS

(54) **Bezeichnung:** SCREENING-VERFAHREN FÜR NERVENZELLEN-BEEINFLUSSENDE WIRKSTOFFE

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for the discovery of pharmacologically active agents which influence the function of nerve cells, comprising the following steps: (a) bringing a sample containing insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP-5) or an active part thereof into contact with at least one potential agent and (b) determining the activity of IGFBP-5 in the sample.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Auffinden von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen, welche die Funktion von Nervenzellen beeinflussen, das die folgenden Schritte umfasst: (a) Inkontaktbringen einer Probe enthaltend Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP-5) oder einen aktiven Teil davon mit mindestens einem potentiellen Wirkstoff und (b) bestimmen der Aktivität von IGFBP-5 in der Probe.

JC14 Rec'd PCT/PTO 27 APR 2005

Verfahren zum Auffinden von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen, die die Funktion von Nervenzellen beeinflussen

5 Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Auffinden von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen, welche die Funktion von Nervenzellen beeinflussen, wobei eine Probe mit einem prospektiven Wirkstoff oder einem Gemisch solcher Wirkstoffe in Kontakt gebracht wird, wobei zugleich oder danach die Aktivität eines biologisch aktiven Moleküls bestimmt wird, und wobei ein prospektiver Wirkstoff oder ein Gemisch solcher Wirkstoffe selektiert wird, wenn die Aktivität des biologisch aktiven Moleküls mit der Inkontaktbringung reduziert oder erhöht wird.

15 Die Erfindung betrifft weiterhin Verwendungen solchermaßen identifizierter Wirkstoffe.

Hintergrund der Erfindung und Stand der Technik

Neuropathien sind Nervenleiden, die mit Störungen der motorischen und/oder sensiblen Nervenleitung einhergehen. Die Ursache für Neuropathien können toxisch, metabolisch, infektiös oder entzündlich sein, wobei eine entzündliche Komponente bei praktisch allen Fällen der Neuropathie beteiligt ist. Die häufigsten Neuropathien sind motorische Neuropathien, die im Verlauf von Diabetes mellitus entstehen. Ein besonderes Merkmal dieser diabetogenen Neuropathien ist die Degeneration der Motorenplatten, der Verlust der Axone und die Atrophie der Motoneuronen. Obwohl die Ursachen der Neuropathie, d. h. die toxischen, metabolischen, infektiösen oder entzündlichen Ursachen, häufig bekannt sind, sind die molekularen Prozesse, die an der Pathogenese beteiligt sind, weitestgehend ungeklärt. Derzeit beschränken sich daher die therapeutischen Ansätze zur Behandlung der Neuropathie auf die Behebung der Ursachen, was nur in wenigen Fällen erreichbar ist, und auch dann nicht zu einer erfolgreichen Behandlung führt, da der Verlust von Axonen nicht wieder rückgängig gemacht werden kann. Eine

Vorraussetzung für eine zielgerichtete und frühe Bekämpfung einer sich bildenden Neuropathie ist daher die Kenntnis der Pathogenese der Neuropathie, mit Hilfe derer Wirkstoffe für die Therapie identifiziert und geprüft werden können.

5 Die Proteine "Insulin-like Growth Faktor" -1 bzw. -2 (IGF-1) und (IGF-2) gehören zu denjenigen Wachstumsfaktoren, die das Überleben von Neuronen und Gliazellen *in vitro* und *in vivo* unterstützen. Diese Faktoren fördern die Teilung von neuralen Vorläuferzellen, die Reifung und das Überleben von
10 Motoneuronen und von Schwanschen-Zellen (Arakawa et al. (1990) J. Neurosci. 10: 3507-3515; Syroid et al. (1999) J Neurosci. 19: 2059-2068).

Untersuchungen an transgenen Mäusen, die entweder mutiertes IGF-1 oder IGF-2 enthielten oder die IGF-1 überexprimierten, deuteten darauf hin, dass IGF die Bildung von Myelin stimuliert (Liu et al. (1993) Cell 75: 59-72; Beck et al. (1995) Neuron 14: 717-730; Carson et al. (1993) Neuron 10: 729-740).

Im Gegensatz zu den meisten Wachstumsfaktoren sind die
20 IGFs in großer Menge im Blutkreislauf vorhanden, aber nur ein sehr kleiner Teil davon liegt in Form von freiem IGF vor. Der Großteil bildet mit den sogenannten "Insulin-like Growth Factor Binding Proteins" (IGFBP) und einem weiteren großen Protein, das als "Acid Labile Subunit" (ALS) bezeichnet wird, Komplexe (Blum et al. (1991) in: Modern Concepts in Insulin-Like Growth Factors, Herausgeber Spencer, Elsevier, New York, 381-893). Bisher konnten sechs verschiedene IGFBPs identifiziert werden (Yamanaka et al. (1997) J Biol. Chem. 272: 30729-30734). Eines dieser Proteine, IGFBP-5, ist ein glykosiertes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 26 kDa, das mit hoher Affinität an IGF-1 und IGF-2 bindet (Drop et al. (1992) Growth Regulation 2: 69-79; WO 97/03470).

IGFBP-5 ist außer in den Nieren in anderen Organen in beträchtlichem Maße im Nervensystem, beispielsweise in Gliazellen und in Purkinjezellen und cerebellären Granulazellen nachzuweisen (Bondy und Li (1993) J. Neurosci. 13: 5092-5104;

Stenvers et al. (1994) J Comp. Neurol. 339: 91-105; Rochier et al. (2001) J Neurochem. 76: 11-20). Immunhistochemische Untersuchungen zeigen eine Lokalisation des Proteins an der Zellmembran von Purkinjezellen. IGFBP-5 ist des Weiteren immunhistologisch an und in myelinisierten Axonen nachweisbar. Durch seine hohe Affinität zur extrazellulären Matrix kann es in dem extrazellulären Raum zwischen Motoneuronen und Schwanschenzellen akkumulieren (Syroid et al. (1999) J Neurosci. 19: 2059-2068; Cheng et al. (1996) Brain Res. Dev. Brain Res. 92: 211-218). Nach Hypoxie/Ischaemie oder nach Verletzung des Ischiasnervs ist die Expression von IGFBP-5 in Nervenzellen erhöht (Li et al. (1996) J Cereb. Blood. Flow Metab. 16: 227-236; Hammerberg et al. (1998) J Comp. Neurol. 400: 57-72). Es ist jedoch weitgehend unklar, welche physiologische oder pathophysiologische Rolle IGFBP-5 im Nervensystem spielt.

Da IGFs das Wachstum von Nervenzellen fördern, wurden Komplexe aus IGF-1 und IGFBP-3 (WO 95/13823 und WO 99/62526), antisense Oligonukleotide, die spezifisch für IGFBP sind, Antikörper, die spezifisch für IGFBP sind, und Peptide zur Hemmung der Bindung von IGFBP (WO 98/32022, WO 98/45427 und WO 99/32620) für die Behandlung einer Reihe von Erkrankungen beschrieben. Diese Erkrankungen schließen auch Erkrankungen des Nervensystems, wie beispielsweise der amyotrope Lateralsklerose (WO 99/32620 und WO 99/62536), die zentrale und peripheren Neuropathien (WO 99/32620), oder die Alzheimer Erkrankung bzw. die Huntington Erkrankung (WO 95/13823), ein. Das Ziel dieser Arbeiten bestand jedoch jeweils darin, die Menge der freien IGF in der Zelle zu erhöhen. Aus keiner der genannten Arbeiten geht jedoch hervor, dass IGFBP-5 kausal an der Entstehung von Neuropathien und dem damit einhergehenden Verlust von Axonen und Degeneration von Motoneuronen beteiligt ist.

Technisches Problem der Erfindung

Der Erfindung liegt das technische Problem zu Grunde, ein Screeningverfahren anzugeben, mittels welchem weitere Substanzen, insbesondere auch nichtnatürliche Substanzen,

identifiziert werden können, die hochwirksam, insbesondere auch wirksamer als IGF-1 oder IGF-2, das Überleben von Nervenzellen fördern.

5 Grundzüge der Erfindung und Ausführungsformen

Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung ein Verfahren zum Auffinden von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen, welche die Funktion von Nervenzellen beeinflussen, welches die folgenden Schritte umfasst: a) Inkontaktbringen einer Probe enthaltend IGFBP-5 oder einen aktiven Teil davon mit einem potentiellen Wirkstoff oder einem Gemisch solcher Wirkstoffe, b) Bestimmen der Aktivität von IGFBP-5 in der Probe und c) Selektion eines Wirkstoffes oder Wirkstoffgemisches, welches die Aktivität von IGFBP-5 in der Probe erhöht 15 oder erniedrigt, insbesondere erniedrigt bzw. hemmt.

Der Erfindung liegt die Erkenntnis zu Grunde, dass die erhöhte Bildung von IGFBP-5 in Nervenzellen zu einer Beeinträchtigung der Funktion der Nervenzellen führt. Transgene Mäuse, die in ihren Motoneuronen IGFBP-5 überexprimieren, zeigen in den der Erfindung zu Grunde liegenden Experimenten einen Verlust ihrer Axone und eine Degeneration ihrer Motoneuronen und entwickeln das klinische Bild einer Neuropathie, das mit den typischen Funktionseinbußen der Nervenzellen einhergeht. Ein weiterer überraschender Befund neben dem Befund aus transgenen Tierexperimenten ist, dass in Nervenzellen von Patienten mit Diabetes mellitus erhöhte Mengen der für IGFBP-5 kodierenden mRNA nachgewiesen werden konnten. Diese Erhöhung von IGFBP-5 ist spezifisch für diabetogene Formen der Neuropathie, da sie nicht in Nerven von Patienten mit nicht diabetischen Formen der Neuropathie gefunden wurde. Somit ist der überraschende Befund, dass eine Ursache der diabetogenen Neuropathie die Erhöhung der Konzentration von IGFBP-5 innerhalb oder in der Nachbarschaft der Nervenzellen ist. Dieser Befund ermöglicht nun, die zielgerichtete Suche nach Wirkstoffen, die 30 die Prophylaxe oder Therapie von Neuropathien, vorzugsweise diabetischer Formen der Neuropathie erlauben, mit Hilfe von 35

Substanzen, die gezielt die Konzentration und/oder die Aktivität von IGFBP-5 innerhalb der Nervenzellen oder in der Nachbarschaft der Nervenzellen reduzieren.

Unter "Funktionen" von Nervenzellen werden beispielsweise die Reizleitung sowie alle daran beteiligten biochemischen und/oder elektrochemischen Prozesse verstanden. Vorzugsweise umfasst der Begriff Funktion jedoch das Überleben von Nervenzellen. Das Überleben von Nervenzellen beispielsweise in einer Zellkulturschale kann durch die Bestimmung der Anzahl der absterbenden Zellen in der Zellkultur erfolgen. Das Absterben von Zellen des zentralen Nervensystems kann beispielsweise durch Testverfahren, die Apoptose nachweisen, beobachtet werden. Solche Testverfahren sind beispielsweise "Tunnel-Assay" (Gavrielli et al. (1992) J. Cell Biol. 119: 493-501; Gold et al. (1994) Lab. Invest. 71: 219-225), Chromatinfragmentierung (Götz et al. (2000) Hum. Mol. Genet. 9: 2479-2489), Zählung von überlebenden und absterbenden Nervenzellen (Arakawa et al. (1990) J. Neurosci. 10: 3507-3515), die Verwendung von Festsubstanzen zur Quantifizierung des Zelltods in Zellkultur (Uliasz und Aewett (2000) J. Neurosci. Methods 100: 157-163), Quantifizierung, der Expression von Zelltod-assoziierten Genen in Nervenzellen, wie beispielsweise Cycline (Timsit et al. (1999) Eur. J. Neurosci. 11: 263-278) und Bestimmung des neuronalen Zelltods nach Zugabe von α - β -Peptid (Iwasaki et al. (1996) Mol. Psych. 1: 65-71) oder nach Induktion von oxidativen Stress (Manev et al. (1995) Exp. Neurol. 133: 198-206).

Das Inkontaktbringen einer Probe mit mindestens einem potentiellen Wirkstoff umfasst jede Form des Mischens der Probe mit dem potentiellen Wirkstoff, wobei sowohl die Probe zu dem potentiellen Wirkstoff hinzugefügt werden kann, als auch der potentielle Wirkstoff zu der Probe. Die Probe und/oder der potentielle Wirkstoff liegt(en) dabei vorzugsweise als Feststoff, Lösung, Suspension, Aufschlämmung oder an eine feste Phase gebunden vor. Wenn es sich bei der Probe, mit der zumindest ein potentieller Wirkstoff in Kontakt gebracht wird, um Zellen handelt, umfasst der Schritt des Inkontaktbringens auch

im Stand der Technik bekannte Verfahren, die das Einführen von Substanzen in intakte Zellen erlauben, wie beispielsweise DNA- "Guns", Infektion, Transfektion und/oder Transformation. Diese Verfahren sind besonders bevorzugt, wenn es sich bei dem potentiellen Wirkstoff um nackte DNA, Viren, Viroide, Virosome und/oder Liposomen handelt, wobei die Liposome oder Virosome auch geeignet sind, neben einem potentiell wirksamen Nukleinsäuremolekül weitere potentielle Wirkstoffe mit der Probe in Kontakt zu bringen. Dem Fachmann sind eine Reihe weiterer Methoden bekannt, die dazu dienen potentielle Wirkstoffe in Zellen einzuführen und die gleichermaßen zum Inkontaktbringen von Probe und potentiellen Wirkstoff geeignet sind.

Eine Probe im Sinne dieser Erfindung ist beispielsweise mindestens eine Zelle, mindestens ein Zelleextrakt, mindestens 15 ein Proteingemisch und/oder ein Gemisch, wobei die Zelle, der Zelleextrakt, das Proteingemisch oder das Gemisch IGFBP-5 oder einen aktiven Teil davon enthält. Die Zellen umfassen beispielsweise pro- und eukaryotische Zellen, insbesondere jedoch Zellen, die als Wildtyp-Zellen IGFBP-5 exprimieren. In Zellen, 20 die als Wildtyp-Zellen nicht oder nur in geringem Maße IGFBP-5 exprimieren, kann durch dem Fachmann bekannte Methoden IGFBP-5 exprimiert bzw. überexprimiert werden. Solche Methoden umfassen beispielsweise Infektion, Transfektion oder Transformation von Zellen mit Vektoren, die Nukleinsäuren enthalten, die für 25 IGFBP-5 oder einen aktiven Teil davon kodieren und unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors, insbesondere zur konstitutiven Expression, stehen. Eine bevorzugte Probe, die in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden kann, ist eine Zelle, die eine erhöhte IGFBP-5 Aktivität im Vergleich zu 30 Wildtyp-Zellen desselben Zell- bzw. Gewebetyps aufweist. Eine solche Zelle kann beispielsweise aus heterozygoten oder homozygoten IGFBP-5 transgenen Mäusen gewonnen werden. Diese Zellen enthalten dann je nach Anzahl der eingeführten Gene beispielsweise zwischen 1 bis ca. 40 zusätzliche Gene, die für 35 IGFBP-5 oder einen aktiven Teil davon kodieren. Im Rahmen dieses erfindungsgemäßen Verfahrens sind Zellen aus heterozygoten

oder homozygoten IGFBP-5 transgenen Mäusen bzw. Mäuseembryonen bevorzugt, insbesondere aus diesen gewonnene Neuronen oder, noch bevorzugter, spinale Motoneuronen. Diese Zellen können beispielsweise mit Hilfe der Panningtechnik (Metzger et al. 5 (1998) J. Neurosci. 18: 1735-1742) isoliert werden.

Des weiteren umfasst der Begriff "Probe" auch Zellextrakte, die beispielsweise aus einer der vorangehend aufgeführten Zellen mit dem Fachmann bekannten Standardverfahren gewonnen werden können. Geeignete Verfahren umfassen, sind 10 aber nicht beschränkt auf, "Freeze-thawing", "Sonification" oder "French-Pressing". Gegebenenfalls kann ein solcher Zellextrakt in einem weiteren Schritt aufgearbeitet bzw. aufgereinigt werden. Bevorzugte Schritte umfassen beispielsweise Präzipitations-, Filtrations- und chromatographische Verfahrensschritte. Geeignete chromatographische Verfahren sind dem 15 Fachmann bekannt und umfassen beispielsweise Anionen- bzw. Kationenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie und/oder Größenausschlusschromatographie. Des Weiteren kann die Probe auch eine Mischung gereinigter oder rekombinanter 20 Proteine enthaltend IGFBP-5 oder einen aktiven Teil davon und/oder ein Gemisch enthaltend IGFBP5 oder einen aktiven Teil davon sein, das zusätzlich weitere Komponenten enthält, wie beispielsweise Komponenten, die für die Bestimmung der Aktivität von IGFBP-5 verwendet werden können.

25 Das Bestimmen der Aktivität von IGFBP-5 in der Probe ist durch eine Reihe direkter und indirekter Nachweisverfahren möglich. Die jeweils geeigneten Verfahren hängen von der Natur der Probe ab. In Zellen wird die Aktivität von IGFBP-5 beispielsweise durch die Menge des in der Zelle exprimierten 30 IGFBP-5 bestimmt oder durch die Fähigkeit des in der Zelle vorhandenen IGFBP-5 an IGF-1 oder IGF-2 zu binden. Die Repression der Transkription des für IGFBP-5 kodierenden Gens kann beispielsweise durch die Bestimmung der Menge der IGFBP-5 mRNA erfolgen. Im Stand der Technik bekannte Standardverfahren zur 35 Bestimmung der IGFBP-5-mRNA Menge umfassen beispielsweise "Northern-Blot" Hybridisierung, RT-PCR, "Primer"-Extension und

"RNA-Protection". Des weiteren kann die Bestimmung der IGFBP-5 Aktivität, die auf der Induktion oder Repression der Transkription des IGFBP-5-Promotors beruht, auch durch die Kopplung des IGFBP-5-Promotors an geeignete Reporterkonstrukte erfolgen. Beispiele für geeignete Reportergene sind das Chloramphenicol-Transferase-Gen, das "Green-Fluorescent-Protein" (GFP) und Varianten davon, das Luciferase-Gen und das Rennilla-Gen. Der Nachweis der Expression von IGFBP-5-Protein kann jedoch auch auf Proteinebene erfolgen, wobei in diesem Falle die Menge des Proteins beispielsweise durch gegen IGFBP-5-Proteine gerichtete Antikörper, polyklonal oder monoklonal, nachgewiesen wird.

Die Änderung der Bindungsfähigkeit von IGFBP-5 an IGF-1 und/oder IGF-2 kann beispielsweise in einem "Two-Hybrid"-System überprüft werden, wobei das Two-Hybrid-System beispielsweise in Hefe oder in höheren eukaryotischen Zellen durchgeführt werden kann. Verglichen wird dann die Interaktionsstärke zwischen IGFBP-5 und IGF-1 und/oder IGFBP-5 und IGF-2, mit oder ohne Zusatz des potentiellen Wirkstoffs.

Handelt es sich bei der Probe beispielsweise um einen Zellextrakt, ein Proteingemisch und/oder ein Gemisch enthaltend IGFBP-5 oder einen aktiven Teil davon, richtet sich die Bestimmung der Aktivität vorzugsweise auf die Bestimmung der Bindungsfähigkeit von IGFBP-5 an IGF-1 und/oder IGF-2. Hierbei kann jeweils entweder die Menge des freien, d.h. ungebundenen IGFBP-5 und/oder die Menge des freien IGF-1 oder IGF-2 bestimmt werden bzw. die Ab- oder Zunahme des freien IGFBP, IGF-1 und/oder IGF-2. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Immunpräzipitation von IGFBP-5, der Bestimmung des jeweils koimmunpräzipitierten IGF-1 und/oder IGF-2, wobei die Menge des jeweils präzipitierten IGF-1 oder IGF-2 durch immunologische Verfahren aber auch durch radioaktive Markierung, Fluoreszenzmarkierung oder ähnliche Markierungen des IGF bestimmt werden kann. Verglichen wird dabei die Menge des freien IGFBP-5 bzw. IGF in der behandelten und unbehandelten Probe.

Wirkstoffe, die die Aktivität von IGFBP-5 in der Probe im Vergleich zur unbehandelten Probe (Kontrolle) verstärken oder hemmen, gelten gemäß dieser Erfindung als pharmakologisch aktive Wirkstoffe, die die Funktion von Nervenzellen beeinflussen. Ein pharmakologisch aktiver Wirkstoff, der die Funktion von Nervenzellen beeinflusst, verändert die Aktivität von IGFBP-5 gegenüber der Kontrolle, jeweils mit der gleichen Methode bestimmt, mehr als ca. 10 %, vorzugsweise jedoch um mindestens ca. 50 % oder um mindestens 100 %, noch bevorzugter um 10 mindestens ca. 500 %. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung verringert der potentielle Wirkstoff die Aktivität von IGFBP-5 im Vergleich zu der unbehandelten Probe.

In einer weiteren Ausführungsform kann sich an den Schritt a) eine Inkubationsverfahrensstufe anschließen, die 15 abhängig von der Probe unterschiedlich lang dauern kann. Wenn es sich bei der Probe um Zellen handelt, wird die Aktivität (Schritt b) nach ca. einer Stunde bis 100 Tagen, vorzugsweise nach ca. 1 Tag bis ca. 50 Tagen, höchstvorzugsweise nach ca. 3 Tagen bis ca. 10 Tagen, insbesondere nach 3 Tagen bestimmt. 20 Wenn es sich bei der Probe um einen Zellextrakt, ein Protein-gemisch oder ein Gemisch handelt, kann die Aktivität beispielsweise nach einem Zeitraum von ca. 0 Sekunden (Messung der Aktivität unmittelbar beim Inkontaktbringen) bis ca. 20 Tagen bestimmt werden. Vorzugsweise beträgt der Zeitraum für 25 die Inkubation nach dem Inkontaktbringen der Probe mit dem potentiellen Wirkstoff jedoch zumindest oder ist gleich ca. 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180 Minuten (McDonald et al. (1999) Analyt. Biochem. 268: 318-329).

Neben der Bestimmung der Aktivität von IGFBP-5 in der 30 Probe beinhaltet das vorliegende Verfahren auch die Bestimmung der Aktivität eines aktiven Teils von IGFBP-5. Ein aktiver Teil von IGFBP-5 enthält im Vergleich zu Wildtyp-IGFBP-5 eine N- und/oder C-terminale Deletion und/oder gegebenenfalls eine oder mehrere interne Deletion, aber auch alternativ oder zusätzlich Mutationen, wobei die Fähigkeit des so deletierten und/oder mutierten IGFBP-5 Teils, in transgenen Mäusen den

Verlust der Axone und Degeneration der Motoneuronen auszulösen, nicht verloren geht. Ein funktionell aktiver Teil von IGFBP-5, der in transgenen Mäusen exprimiert wird, hat mindestens ca. 10 %, vorzugsweise mindestens ca. 20 %, bevorzugter 5 mindestens 50 % und am bevorzugtesten mindestens ca. 100 % der Aktivität von Wildtyp IGFBP-5.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, enthält die Probe mindestens eine Zelle, mindestens einen Zelleextrakt, mindestens ein Proteingemisch und 10 d/oder ein Gemisch enthaltend IGFBP-5 oder einen aktiven Teil davon. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Zelle eine neuronale Zelle, insbesondere eine sensorische, empathische oder motorisch-neuronale Zelle, eine neuronale Stammzelle, ein Neuron, insbesondere ein 15 cholinerges Neuron des basalen Vorderhirns, eine dopaminerige Nervenzelle des Mittelhirns, eine Körnerzelle, eine Purkinjezelle des Kleinhirns oder des Hypokampus, eine retinale Ganglionzelle oder ein Photorezeptor. Bei Verwendung eines Zelletrakts oder eines Proteingemischs ist dieses vorzugsweise 20 aus einer der voran genannten Zellen hergestellt bzw. isoliert.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besitzt die Zelle eine erhöhte IGFBP-5 Aktivität im Vergleich zu einer Wildtyp-Zelle, wobei diese erhöhte 25 Aktivität beispielsweise auf der Stimulation der Expression von IGFBP-5 und/oder die Transfektion durch IGFBP-5 enthaltende Vektoren und/oder Insertion von IGFBP-5 kodierenden Genen beruht. Analoges gilt im Falle aktiver Teile des IGFBP-5.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Aktivität von IGFBP-5 in der Zelle durch die Überlebensrate der Zellen bestimmen, optional zusammen mit einer anderen IGFBP-5 spezifischen Methode zur Bestimmung der Aktivität. Diese Bestimmung der Aktivität ist von besonderem Interesse in Zellen, die beispielsweise auf Grund der Einführung zusätzlicher IGFBP-5 Gene, erhöhte IGFBP-5 Aktivität besitzen, und die deshalb im Vergleich zur jeweiligen Wildtyp-

Zelle eine verringerte Überlebensrate besitzen. Eine Verlängerung der Überlebensrate dieser Zellen nach Inkubation mit mindestens einem potentiellen Wirkstoff dient dabei als indirektes Mittel der Bestimmung der Aktivität von IGFBP-5 in der 5 Probe. Ein pharmakologisch aktiver Wirkstoff verlängert dabei die Überlebensrate der Zellen um mindestens ca. 20%, vorzugsweise um mindestens ca. 50%, noch bevorzugter um mindestens ca. 100%, und noch weiter bevorzugter um mindestens ca. 1000% im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Am meisten bevorzugt 10 sind solche Wirkstoffe, die bei Zugabe zu den Zellen zu einem dauerhaften Überleben der Zellen in der Zellkultur führen und/oder in einer IGFBP-5-transgenen Maus den Verlust der Axone und die Degeneration von Motoneuronen verhindern.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen 15 Verfahrens wird die Aktivität von IGFBP-5 in der Probe durch die Menge des IGFBP-5 Proteins, die Menge der dafür kodierenden Nukleinsäuren und/oder die Bindungsaktivität von IGFBP-5 bestimmt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen 20 Verfahrens weist die Verringerung der Aktivität von IGFBP-5 in der Probe nach Inkontaktbringen mit mindestens einem potentiellen Wirkstoff darauf hin, dass der potentielle Wirkstoff ein pharmakologisch aktiver Wirkstoff ist, welcher die Funktion von Nervenzellen beeinflusse.

25 Wenn es sich bei dem potentiellen Wirkstoff um eine Wirkstoffmischung handelt, wird in einem weiteren Schritt aus dieser Wirkstoffmischung der pharmakologisch aktive Wirkstoff isoliert, beispielsweise durch Deconvolution.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens 30 ist die Probe kompartimentalisiert, beispielsweise auf einer Mikrotiterplatte mit einer Mehrzahl von Vertiefungen, z.B. 96, 384, oder 1525 Vertiefungen. Solche Mikrotiterplatten werden bereits routinemäßig in vollautomatischen, massiv parallelen Testverfahren eingesetzt (sogenannte "High throughput 35 screens"), die es erlauben, in kurzer Zeit hunderttausende verschiedene Wirkstoffe zu testen. Grundsätzlich ist jede

Kompartimentalisierung geeignet, die es ermöglicht, die Wirkung des mit der Probe in Kontakt gebrachten potentiellen Wirkstoffs räumlich zu beschränken, so dass die Auswirkungen des jeweils verwendeten potentiellen Wirkstoffs auf die Aktivität von IGFBP-5 oder eines aktiven Teils davon in der Probe bestimmt werden kann. Die Probe kann kovalent oder nicht-kovalent mit der Oberfläche des Probenträgers, wie beispielsweise eine Mikrotiterplatte, verknüpft sein oder als eine Lösung, Suspension oder Aufschlammung vorliegen. Neben den im Stand der Technik bekannten verschiedenen Mikrotiterplatten-Formaten, die für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet sind, sind jedoch auch planare oder beispielsweise durch Vertiefungen oder Kanäle strukturierte Probenträger geeignet. Im Falle planarer Probenträger können Probenareale hydrophobiert sein, wobei Tropfen mit der Probe auf solche Areale aufgebracht werden. Alternativ können die Tropfen auf voneinander abgegrenzte nicht-hydrophobierte Areale aufgebracht werden. Der Probeträger kann beispielsweise aus Glas, Silizium, Metall oder Kunststoff sein.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist mindestens ein potentieller Wirkstoff kovalent oder nicht-kovalent mit einem Probenträger verknüpft, wobei die Oberfläche des Probenträgers vorzugsweise in Form von Vertiefungen, Kanälen oder auch planar strukturiert ist. Die Probe wird darin mit dem immobilisierten potentiellen Wirkstoffen in Kontakt gebracht und die Aktivität von IGFBP-5 in der Probe an der jeweiligen Immobilisierungsstelle des (der) potentiellen Wirkstoff(e) bestimmt. Beispielsweise kann mit Standardverfahren, die beispielsweise aus WO 89/19977, WO 90/15070, WO 95/35505 und US 5,744,305 bekannt sind, ein Proteinchip hergestellt werden, der an der Oberfläche unterschiedliche Peptidfragmente enthält, deren Einfluss auf die Aktivität von IGFBP-5 getestet werden kann. Gleichermassen können auch auf einer Oberfläche mit im Stand der Technik bekannten kombinatorisch-chemischen Verfahren eine Vielzahl verschiedener chemischer Substanzen erzeugt werden, deren Wirkung auf die

Aktivität von IGFBP-5 durch das erfindungsgemäße Verfahren untersucht werden kann.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der pharmakologisch aktive Wirkstoff bzw. der isolierte pharmakologisch aktive Wirkstoff in einem weiteren Schritt zu einem Medikament oder Diagnostikum konfektioniert, wobei dem pharmakologisch aktiven Wirkstoff gegebenenfalls geeignete Hilfs- und Zusatzstoffe zugesetzt werden, und wobei eine physiologisch wirksame Dosierung eingestellt wird.

10 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der pharmakologisch aktive Wirkstoff in weiteren Verfahrensschritten mit dem Fachmann bekannten Methoden, die beispielsweise Modifikationen mit Halogen, insbesondere mit Fluor oder Chlor und/oder kombinatorische chemische Ansätze umfassen, modifiziert und erneut in dem erfindungsgemäßen Verfahren auf die Beeinflussung der Aktivität von IGFBP-5 hin untersucht, wobei die Aktivität von IGFBP-5 in der Probe, die mit dem modifizierten pharmakologisch aktiven Wirkstoff behandelt wurde, mit der Aktivität von IGFBP-5 in der Probe bei 20 Verwendung des Ausgangswirkstoffs verglichen wird und eine Verbesserung der Wirksamkeit des pharmakologisch aktiven Wirkstoffs insbesondere eine stärkere Verringerung der Aktivität von IGFBP-5 in der Probe im Vergleich zum Ausgangswirkstoff als Maßgabe für eine Selektion verwendet wird. Eine solche 25 Verringerung beträgt mindestens ca. 5%, vorzugsweise mindestens ca. 10%, noch bevorzugter mindestens ca. 50%, gegenüber dem Ausgangswirkstoff. Nachdem für einen modifizierten pharmakologisch aktiven Wirkstoff eine Verbesserung der Verringerung der Aktivität von IGFBP-5 in der Probe festgestellt worden 30 ist, kann mit chemischen und/oder physikalischen Standardverfahren, wie beispielsweise Massenchromatographie bzw. GC-MS, 1H-NMR-Chromatographie, oder IR-Spektroskopie die Struktur des modifizierten Wirkstoffs bestimmt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist 35 ein Testsystem zum Auffinden pharmakologisch aktiver Wirkstoffe, welche die Funktion von Zellen des Nervensystems

beeinflussen, enthaltend: a) mindestens eine Probe enthaltend IGFBP-5 oder einen aktiven Teil davon und b) mindestens ein Mittel zur Bestimmung der Aktivität von IGFBP-5 in der Probe.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist
5 die Verwendung mindestens eines Wirkstoffs zur Prophylaxe un-
d/oder Therapie von Erkrankungen, die mit Zellwachstumsstörun-
gen von Nervenzellen einhergehen, insbesondere der diabetoge-
nen Neuropathie, wobei der verwendete Wirkstoff in dem voran-
gehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren aufgefunden
10 wurde.

Die vorliegende Erfindung zeigt erstmals die Bedeutung von IGFBP-5 für die Pathogenese der diabetogenen Neuropathie. Daher ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung
die Verwendung mindestens einer Wirksubstanz zur Prophylaxe
15 und/oder Therapie diabetogener Neuropathie, dadurch gekenn-
zeichnet, dass die Wirksubstanz die Aktivität von IGFBP-5
hemmt.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird dabei eine der folgenden Wirksubstanzen verwendet: IGF- 1, IGF-2, eine Mutante von IGF-1 und/oder IGF-2 mit erhöhter Bindungsaffinität zu IGFBP-5 (Luthi et al., Eur. J. Biochem., 205, 483-480 (1992); Lowman et al., Biochemistry, 37, 8870-8878, (1998)), ein aktives Fragment von IGF- 1 und/oder IGF-2, eine Substanz, welche an die Heparin-bindende Domäne des IGFBP-5 bindet (Song et 25 al., J. Mol. Endocrinol., 24, 43-51 (2000)), eine Substanz, welche die Expression und/oder Freisetzung von IGF-1 und/oder IGF-2 stimuliert, eine Nukleotidsequenz, die für IGF-1 und/o-
der IGF-2 kodiert, eine Nukleotidsequenz, die für eine Mutante von IGF-1 und/oder eine Mutante von IGF-2 mit erhöhter Bin-
30 dungsaffinität zu IGFBP-5 kodiert, eine Nukleotidsequenz, die für ein aktives Fragment von IGF-1 und/oder ein aktives Frag-
ment von IGF-2 kodiert, und/oder eine Nukleotidsequenz, die für einen IGFBP-5 bindenden Antikörper oder Antikörperfragment kodiert.

35 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird eine Wirksubstanz verwendet, die die Expression und/oder

Freisetzung von IGF-1 und/oder IGF-2 stimuliert. Bevorzugte Wirksubstanz, die die Expression und/oder Freisetzung von IGF-1 und/oder IGF-2 stimulieren sind: Antiprogestine, z.B. Tamoxifen (Quin et al., Endocrinology, 1, 40, 2501-2508 (1999)),
5 Antioestrogene, z.B. Mifepriston (Bitar, et al, Surgery, 127, 687-695 (2000)), das osteogene Protein-1 (OP-1), das "bone morphogenic protein-2" (BMP-2), der "basic fibroblast growth factor" (bFGF), der "transforming growth factor β -1" (TGF β -1), der "platelet derived growth factor BB" (PDGFBB),
10 Interleukin-1 Rezeptor Antagonisten, z.B. IL-RA (Benbassat et al., Horm. Metab. Res. 31, 209-215 (1999)), Antagonisten des Retinsäure-alpha-Rezeptors (Han et al., J. Biol. Chem., 272, 13711-13716 (1997), und/oder Inhibitoren des Prostaglandins-2 (McCarthy et al., J. Biol. Chem., 22, 6666-6671 (1996)).
15 Bezuglich IGFBP-5 mRNA sowie des Translationsproduktes wird auf die folgenden Accession Nummern verwiesen. Homo sapiens: NM_000599, M62782, L27560, L27556, L27557, L27558, L27559 und M65062 (jeweils ursprüngliche sowie Fassung vom 05. Juli 2002). Mus musculus: NM_010518, XM_129718, AF179369, X81583,
20 AAC37636 und L12447. Rattus norvegicus: AF179370, AF139830, NM_012817, AAA53533 und M62781. Aktive Teile hiervon sind insbesondere der C-terminale Bereich bzw. die Heparin bindende Domäne oder eine Teilsequenz der Heparin bindenden Domäne einer Mindestlänge von 4, vorzugsweise 8, höchstvorzugsweise 10,
25 Aminosäuren. Die Heparin bindende Domäne ist im Falle des Translationsproduktes gemäß Accession Nummer NM000599 aa216-266. Die Heparin bindende Domäne ist im Falle des Translationsproduktes gemäß Accession Nummer M62781 aa215-265. Die Heparin bindende Domäne ist im Falle des Translationsproduktes
30 gemäß Accession Nummer L12447 aa215-265.

Unter die Begriffe des IGFBP-5 oder eines aktiven Teils hiervon fallen auch homologe Sequenzen, insbesondere Aminosäuresequenzen, zu den vorstehend angegebenen Sequenzen und Teilsequenzen hieraus. Der Begriff der Homologie ist dabei wie 35 folgt definiert. Als Homologiekriterium wird der Expect-Wert verwendet, wie er sich bei Anwendung des Programmes BLASTP

2.2.4 [Aug-26-2002] ergibt. Homologie zu einer Query-Aminosäuresequenz einer Länge von größer 20 aa liegt dann vor, wenn der Expect-Wert kleiner als 0,1, insbesondere kleiner als 0,01 oder 0,001, ist. Homologie zu einer Query-Aminosäuresequenz 5 einer Länge von kleiner oder gleich 20 aa liegt dann vor, wenn der Expect-Wert größer oder gleich 0,1, insbesondere 0,01 oder 0,001, und kleiner als 10, insbesondere 1, ist.

Eine Probe im Sinne der Erfindung kann folglich beispielsweise ein Polypeptid oder ein Oligopeptid enthalten, 10 welches eine Teilsequenz des IGFBP-5, insbesondere der Heparin bindenden Domäne des IGFBP-5, einer Mindestlänge von 4, 10, 20 oder 40 Aminosäuren enthält, oder ein Homolog hierzu. Bevorzugt sind Mindestlängen von 20 bis 40 Aminosäuren. Hierbei ist es unkritisch, ob und welche Aminosäuresequenzen an die Teil- 15 sequenz N- und/oder C-terminal angeschlossen sind.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher beschreiben, ohne sie zu beschränken.

20 Beispiel 1: Auslösung einer Neuropathie in Mäusen durch Überexpression von IGFBP-5

a) Isolierung des IGFBP-5 Klones

Eine Lambda-ZAPII cDNA Bibliothek aus dem Hirn einer 25 Maus wurde mit einer 873 bp IGFBP-5-cDNA Probe geprüft. Diese Probe wurde mit Hilfe der PCR (Primer: Hinreaktion 5'-GCC CCG AGG TAA AGC CAG ACT-3' (SEQ ID NO. 1), Rückreaktion 5'-GGA TAG GGG GAG GAA GGG AGG-3' (SEQ ID NO. 2)) hergestellt und enthielt die gesamte kodierende Sequenz und 48 bp der 30 5'-nichttranslatierten Region.

Klone, von denen mit Hilfe der o.a Primer eine cDNA in kompletter Länge amplifiziert werden konnten, wurden mit Hilfe der Plaque-Technik gereinigt und nachfolgend vermehrt. Die cDNA wurde in die EcoRI-Schnittstelle des Polylinkers eines 35 pBS II SK Vektors mit Hilfe des Exassist/SOLR Systems (Fa. Stratagene, La Jolla Ca.) gemäß der Anleitung des Herstellers

eingefügt. Die Identität der Klone wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

b) Herstellung von NFL-IGFBP-5 transgenen Mäusen

5 Ein 1,8 kb EcoRI-Fragment, welches die IGFBP-5 cDNA enthielt, wurde aus dem PBSII SK-Vektor unter Verwendung der Polylinker Eco RV-Schnittstelle und einer Nse I-Schnittstelle in der 3'UTR isoliert und die PolyA-Region vom pMCCre (Gu et al. 1993) Cell 73: 1155-1164) wurden NSE-BP5 isoliert und mit den 10 stumpfen Enden in den pKS-NFL-Vektor zwischen den Xho I/Cla I-Schnittstellen eingefügt.

Aus diesem NFL-IGFBP-5 DNA-Konstrukt wurde mit Hilfe des Restriktionsenzyms Sma I ein Fragment mit 8 kB, das den menschlichen Neurofilament-Leichtketten (NFL)-Promotor, die 15 cDNA für IGFBP-5 der Maus, das poly A Signal von pMC-Cre und die Exons 2-4 des NFL Genes (in der stromabwärts gelegenen Region) enthielt, hergestellt.

Das Fragment wurde zweimal über Gel und nachfolgend über Nucleotrap-Harz (Fa. Machery und Nagel, Düren, D) gereinigt, 20 mit Butanol extrahiert, nachfolgend entsalzt und schließlich mit Hilfe von Elutip (Fa. Schleicher und Schüll, Dassel, D) gereinigt. Die eluierte DNA wurde mit Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert und nachfolgend mit Ethanol präzipitiert.

25 Für die Mikroinjektion wurde die DNA in steriler Pufferlösung (5 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0,1 mM EDTA) suspendiert (Konzentration ca. 500 Kopien/pl) und diese Suspension in befruchtete Oozyten der Maus infiziert.

Neun Zuchttiere, die den Vektor integriert hatten, konnten 30 in der genomischen DNA der Tiere mit Hilfe von PCR und Southern Blot Analyse identifiziert werden. Für die PCR-Reaktion zur Bestimmung des Genotyps wurden folgende Primer benutzt: Hinreaktion: NFL-SEQ 5'-TCG CAG GCT GCG TCA GGA G-3' (SEQ ID NO. 3); Rückreaktion: BP5 PCR 5'- CTT GCA GGT AGA GCA GGT GCT 35 CTC-3' (SEQ ID NO. 4). Es wurden 45 Zyklen von 45 s bei 94°C, von 45 s bei 53°C und 30 s bei 72°C durchgeführt.

Für Southern Blots wurde die DNA-Probe mit Xho I verdaut und mit einer radioaktiv markierten IGFBP-5 PCR-Probe getestet.

5 c) Charakterisierung von NFL-IGFBP-5 transgenen Mäusen

Verschiedene Gewebe unter Einschluss von Rückenmark, Kleinhirn und Hippokampus von erwachsenen IGFBP-5 transgenen Mäusen und nicht transgenen Kontrollmäusen wurde in 1 ml TRI-ZOL Reagenz (Fa. Life Technologies) homogenisiert und aus dem Homogenat wurde die Gesamt-RNA nach Angabe des Herstellers gereinigt.

Für jede RT-PCR Reaktion wurde 1 µg der Gesamt-RNA vorgelegt. Der erste DNA-Strang wurde mit Oligo-(dT) Primer synthetisiert (Fa. Life Technologies). Die Primer zur Amplifizierung von IGFBP-5 waren: 5'-Primer: 5'-CTT TCG TGC ACT GTG AAC C-3' (SEQ ID NO. 5); 3'-Primer: 5'-CTC AAC GTT ACT GCT GTC G-3' (SEQ ID NO. 6).

Zur Kontrolle wurde folgende Primer zur Amplifizierung von β-Actin verwendet: 5'-Primer: 5'-GTC GGC CGC CCT AGG CAC 20 CAG-3' (SEQ ID NO. 7); 3'-Primer: 5'-CTC TTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3' (SEQ ID NO. 8). Jeweils 32 Zyklen wurden bei 94°C für 30 s, bei 52°C für 30 s und bei 72°C für 1 min durchgeführt.

Während in Rückenmark transgener Tiere im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine erhöhte Expression von IGFBP-5 mRNA nachgewiesen werden konnte, war in den anderen getesteten Organen kein eindeutiger Unterschied in der Expression von IGFBP-5 RNA zwischen transgenen und Kontrolltieren nachweisbar.

30 Für die SDS-PAGE Liganden Western-Blot Analyse wurden zwei transgene und zwei Wildtyp Kontrollmäuse mit gleichem genetischem Hintergrund getötet und von allen Organen einschließlich dem Nervensystem (Ischias Nerv, Kleinhirn, Rückenmark Hirnrinde, Hippocampus und Seh-Nerv) Gewebeproben entnommen. Diese wurden homogenisiert, in Puffer lysiert und zentrifugiert. Die löslichen Proteine wurden auf einem 12%igen

denaturierenden Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch getrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden in einer Elektroblotting Apparatur auf Nitrozellulosemembran überführt (Electroblotting Apparat Fa.Biometra GmbH, Göttingen, D).

5 Die Membranen wurden mit Jod-markiertem IGF-2 unter Verwendung der von Hossenlopp et al. (1986) Anal Biochem 154: 138-143 beschriebenen Technik getestet. An IGFBP-5 gebundenes radioaktives Jod wurde autoradiographiert.

Die Ergebnisse zeigten eine verstärkte Expression von
10 IGFBP-5 im Rückenmark und im Ischiasnerv transgener Tiere.

d) Diagnose der Neuropathie in IGFBP-5 überexprimierenden, transgenen Mäusen

An den transgenen wie auch an den wildtyp-Kontrollmäusen
15 wurde die Muskelkraft der Vordergliedmaßen (Methode wie beschrieben von Masu et al. (1993) Nature 365: 27-32) bestimmt. Obwohl kein Unterschied im Körpergewicht beider Tiere bestand, wurde bei den transgenen Mäusen eine starke Reduktion in der Greifstärke der Vordergliedmaße festgestellt.

20 Zur Analyse dieser klinischen Symptome wurden histomorphologische Untersuchungen durchgeführt. Sie bestanden in der morphometrischen Untersuchung des Ischias-Nerven, des Bauchfellnerven und der Ganglien des Vorderhorns des Rückenmarkes. Für diese Untersuchungen wurden Proben der entsprechenden Ge-
25 webe nach Fixation in Osmiumtetroxid in Epoxyd-Harz eingebettet und Semidünnschnitte hergestellt. Gewebeschnitte wurden unter dem Lichtmikroskop analysiert und mit Hilfe der Quantimed 500 Software (Fa. Leica GmbH, Bensheim, Deutschland) morphometrisch ausgewertet. Hierbei wurde die Anzahl der in-
30 takten myelinisierten Nervenfasern in den quergeschnittenen Nerven gezählt. Die Anzahl degenerierter Fasern wurde an Hand der Wallerschen Degeneration bestimmt.

Während zwischen transgenen und Kontrollmäusen keine Unterschiede in der Myelinisierung der motorischen Nerven (Is-
35 chiasnerv und Bauchfellnerven), der Vaskularisierung und dem endoneurialem Bindegewebe festgestellt wurden, wiesen die

motorischen Nerven der transgenen, IGFBP-5 exprimierenden Mäuse erhebliche Verluste an Axonen und degenerierte Fasern auf.

Zusätzlich wurde die Cholinesterase-Aktivität an den neuromuskulären Endplatten in Muskelproben (Zwerchfell-, Gluteus- und Stemocleidomastoides-Muskulatur) histochemisch mit Hilfe der kombinierten Acetylcholinesterase-Silber Färbung (Namba (1971) Exp. Neurol. 33: 322-328; Gurney et al. (1992) J. Neurosci. 12: 3241-3247) bestimmt.

Des weiteren erfolgte in Proben des Gastrocnemius-Muskels eine quantitative Bestimmung der Acetylcholinesteraseaktivität. Hierzu wurden die Muskelproben mit Zugabe von 0,5% Triton X-100 für die Bestimmung der gesamten (löslichen wie auch membrangebundenen) Enzymaktivität und ohne Zugabe von Triton X100 für die Bestimmung der löslichen Acetylcholinesteraseaktivität homogenisiert. Die Bestimmung der jeweiligen Enzymaktivität erfolgte nach Zentrifugation der Homogenate (15 min, 15.000 g, 4°C) in den jeweiligen Überständen nach der Methode von Ellmann (Schegg et al. (1990) Neurosci. Lett. 118: 197-200).

Während die histomorphologische Untersuchung dieser Muskelproben in Bezug auf motorische Endplatten und des Verhältnisses von Axonen zu Endplatten bei Jungtieren keine Unterschiede zwischen transgenen und Kontrolltieren ergab, waren in älteren, 6 Monate alten transgenen Mäusen in der Gluteusmuskulatur ein vermehrtes terminales Ausknospen der Axone festzustellen. Parallel hierzu war die freie Cholinesterase-Aktivität erhöht und die membrangebundene vermindert.

Um zu klären, ob der Verlust von Axonen in den transgenen Mäusen das Ergebnis oder die Ursache des Absterbens von motoneuralen Zellen ist, wurde die Anzahl der Motoneurone im facialem Nucleus wie auch im lumbaren Abschnitt des Rückenmarkes bei transgenen und Kontrollmäusen unterschiedlichen Alters gezählt.

Während bei Jungtieren keine Unterschiede nachweisbar waren, zeigten etwa 5-6 Monate alte transgene Mäuse eine deutliche Verminderung der Motoneurone und eine Zunahme von

degenerierten Motoneuronen sowohl im facialem Nucleus als auch im ventrolateralen Horn des Rückenmarkes.

Nach Durchschneiden des Facialisnerven bei neugeborenen und 3-Wochen alten, transgenen Mäusen konnte 1 Woche später 5 keine Verminderung der Motoneurone festgestellt werden. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Degeneration der Motoneurone bei Mäusen, die transgen für IGFBP-5 sind, die Ursache für den Verlust der Axone darstellt.

10

Beispiel 2: Charakterisierung von Nerven von Patienten mit Diabetes mellitus

Von Gesunden wie auch von Patienten mit diabetischer Neuropathie wurden aus Nerven-Biopsieproben die Proteine nach 15 Standardverfahren (Fa. Life Technologies, Karlsruhe, D) isoliert und diese auf einem 12%igem SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Die separierten Proteinproben wurden auf eine Nitrozellulose-membran überführt, anschließend wurden diese Membranen für eine Stunde durch Inkubation in einer Puffer-Lösung, die Pfer-20 deserum und fettfreies Trockenmilchpulver enthielt, blockiert.

Nachfolgend erfolgte der Nachweis des IGFBP-5 mit Hilfe eines IGFBP-5 spezifischen Kaninchen-Antikörpers (Fa. Santa Cruz, Göttingen, D, dessen spezifische Bindung durch einen Peroxydase-gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörper nachgewiesen 25 wurde. Die Peroxydase wurde mit dem ECL-Reagenz (Fa. Amersham, Braunschweig, D) entsprechend den Anweisungen des Herstellers nachgewiesen. Zur Kontrolle erfolgten die gleichen Reaktionsschritte mit einem anti- β -Actin-Antikörper aus der Maus und einem Peroxydase-gekoppelten anti-Maus-Antikörper.

30 Die Ergebnisse zeigen, dass bei Patienten mit diabetischer Neuropathie das IGFBP-5 in den Nervenbiopsien in deutlich größerer Menge anzutreffen ist, als in Gesunden.

35

Beispiel 3: Isolierung und Zucht von Nervenzellen, welche IGFBP-5 überexprimieren, zur Testung von Wirkstoffen

5 Von Embryonen im Alter von 12,5 Tagen, die entweder normal oder aber für IGFBP-5 transgen waren, wurden spinale Motoneurone mit Hilfe der Panningtechnik (Metzger et al. (1998) J Neurosci. 18: 1735-1742) unter Verwendung eines monoklonalen anti-p75-Antikörpers aus der Ratte (Chemicon, Hofheim, 10 Deutschland) isoliert. Hierzu wurden die ventrolateralen Teile des lumbalen Rückenmarks mechanisch zerkleinert, in Hepespuffer-Lösung (enthaltend 10 µM 2-Mercaptoethanol) übertragen und mit Trypsin (0,05%, 10 min) inkubiert. Die Einzelzellssuspension im Überstand wurde in eine mit dem anti p75-Antikörper beschichteten Kulturschale überführt und bei Raumtemperatur für 15 30 min. inkubiert.

Nachfolgend wurden die einzelnen Kulturschalen gewaschen, anschließend die anhaftenden Zellen von der Kulturplatte durch 0,8% Kochsalzlösung, die 35 mM KCl und 1 µM 20 2-Mercaptoethanol enthielt, abgelöst.

Die so gewonnenen Zellen wurden in einer Dichte von 2000 Zellen/cm² in Kulturplatten (Greiner, Nürtingen, Deutschland), die mit Polyornithin und Laminin vorbeschichtet waren, ausgesät. Die Zellen wurden bei 37°C in Neurobasalmedium (Life 25 Technologies, ergänzt mit B27-Supplement, 10% Pferdeserum, 500 µM Glutamat und 50 µg/ml Apotransferrin) und in einer 5% CO₂ Atmosphäre gehalten. 50% des Zellkulturrmediums wurden am 1. Tag und nachfolgenden jedem 2. Tag ersetzt.

Die Analyse der mRNA, die für IGFBP-5 kodiert, wurde mit 30 Hilfe der RT-PCR durchgeführt. RNA wurde mittels Trizol-Reagenz (Life-Technologies, Karlsruhe) isoliert und je 10 ng Gesamt-RNA wurde pro RT-PCR Reaktion eingesetzt. Die RT-PCR wurde, wie im Beispiel 1 c) bereits beschrieben, durchgeführt.

Von Embryonen im Alter von 12,5 Tagen, die hinsichtlich 35 des IGFBP-5-Gens normal oder transgen waren, wurden des weiteren sensorische Neuronen isoliert. Hierzu wurden dorsale

Wurzelganglien isoliert, in PBS aufgenommen und anschließend mit Trypsin (0,05% in Hepesbuffer) für 30 min. inkubiert. Die Trypsinverdauung wurde durch Zugabe von L15-Medium, das 10% Pferdeserum enthielt, gestoppt und nachfolgend wurden die Zellen 5 in Kulturplatten ausplattiert und für 3-4 Stunden inkubiert. Zellen im Überstand wurden zentrifugiert (10 min. bei 400 g) und das Zellsediment wurde genauso, wie bereits für spinale Motoneurone beschrieben, im Neurobasalmedium gehalten.

Neurale Stammzellen wurden aus dem Gehirn von normalen 10 Mäuseembryonen, oder von Mäuseembryonen, die transgen für IGFBP-5 sind, isoliert. Der Bereich des Vorderhirns wurde unter einem Präparationsmikroskop entnommen, in weiter entwickelten Embryonen auch der Bereich des Hippocampus und der periventrikulären Zone. Diese Gehirnareale wurden dann in 200 µl 15 HBSS (Hanks balanced salt solution (HBSS, Fa. Life Technologies (Karlsruhe), transferiert, mit 0,1% Trypsin (Endkonzentration in HBSS) für 10 min bei 37°C, inkubiert, die Reaktion mit 0,1% Trypsin-Inhibitor (Trypsin-Inhibitor aus egg yolk sack (Sigma, Deisenhofen), Stammlösung: 1% in HBSS/25 mM HEPES) Endkonzentration in HBSS abgestoppt. Dann wurden die Zellen 20 zehnmal mit einer 200 µl Pipette trituriert und in Medium [(Neurobasal-Medium (Life Technologies), B27 Supplement (Life Technologies Stock 50x, EK 1x) Glutamax II (Life Technologies Stock 100x, EK 1x), basicFGF (20ng/ml), EGF (20 ng/ml)] in 25 ein Volumen von 5 ml überführt. Die dissozierten Zellen wurden in Kulturschalen (50 ml Sarstedt,) kultiviert (Brutschrank, 37°C, 5% CO₂ feuchtigkeitsgesättigte Atmosphäre) und das Medium alle zwei Tage gewechselt. Die Zellen wachsen als Embroidbodies und attachieren nicht, daher wurden die Zellen 30 zum Mediumwechsel in ein Falcon-Röhrchen überführt und 5 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment trituriert und in frisches Medium aufgenommen. Spätestens nach 3 Passagen bildeten sich große Embroidbodies, die trypsinisiert (s.o.) und in niedriger Zelldichte (max. 35 10.000 Zellen/Platte) auf 10 cm Schalen (Sarstedt) plattiert werden können. Einzelzellen wurden dann gepickt und zunächst

in 96 "well"-Platten, später in 24 und schließlich
12-"well"-Platten expandiert. Diese Einzelzellklone neuraler
Stammzellen können dann auf ihre Differenzierungskapazität hin
untersucht werden und anschließend in erfindungsgemäßen Test-
5 verfahren eingesetzt werden.

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die
Zellen auch als Linien etabliert und für spätere Experimente
eingefroren und gelagert.

Das Einfrieren der neuralen Stammzellen erfolgte nach
10 Standardprotokoll, d.h. nach der Zentrifugation wurden die
Zellen in Medium mit 10 % DMSO aufgenommen und mit 1°C/min
zunächst auf -86°C abgekühlt (im MrFrosti), um dann im flüssi-
gen N2 bei - 186°C gelagert zu werden.

15

Beispiel 4: Verfahren zum Auffinden von Nervenzell-schützenden
Substanzen

Nervenzellen, die beispielsweise mit der oben angeführ-
ten Methode gewonnen sind, können für die Suche nach Substan-
20 zen benutzt werden, welche in Nervenzellen die Expression oder
die Funktion von IGFBP-5 inhibieren.

Hierzu werden IGFBP-5 überexprimierende und normale mo-
torische Neuronen und sensorische Neuronen wie oben beschrie-
ben gewonnen, in Zellkulturen ausgesät und mit der Prüfsub-
25 stanz oder einem Gemisch von Prüfsubstanzen versetzt. Substan-
zen oder Gemische, welche die Funktion oder die Expression von
IGFBP-5 inhibieren, sind in der Lage, das Absterben von IGFBP5
überexprimierender Neuronen zu verhindern, ohne das Überleben
von normalen Neuronen zu beeinträchtigen.

30

35

Patentansprüche

1. Verfahren zum Auffinden von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen, welche die Funktion von Nervenzellen beeinflussen, das die folgenden Schritte umfasst:
 - a) Inkontaktbringen einer Probe enthaltend IGFBP-5 oder einen aktiven Teil davon mit mindestens einem potentiellen Wirkstoff,
 - b) Bestimmen der Aktivität von IGFBP-5 in der Probe, und
 - c) Selektion eines Wirkstoffes, welcher die Aktivität von IGFBP-5 verändert, insbesondere reduziert, gegenüber der Aktivität des IGFBP-5 ohne Inkontaktbringung oder mit Inkontaktbringung mit einer Referenzsubstanz, welche die Aktivität von IGFBP-5 nicht beeinflußt oder um einen definierten Referenzwert verändert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Probe mindestens eine Zelle, mindestens einen Zellextrakt, mindestens ein Proteingemisch und/oder ein Gemisch enthaltend IGFBP-5 oder einen aktiven Teil davon, enthält.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Zelle eine neuronale Zelle, insbesondere eine sensorische, sympathische oder motorische neuronale Zelle, eine neuronale Stammzelle, ein Neuron, insbesondere ein cholinerges Neuron des basalen Vorderhirns, eine dopaminerge Nervenzelle des Mittelhirns, eine Körnerzelle, eine Purkinje-Zelle des Kleinhirns oder des Hippocampus, eine retinale Ganglienzelle oder ein Photorezeptor ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 oder 3, wobei die Zelle eine erhöhte IGFBP-5 Aktivität hat.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, wobei die Aktivität von IGFBP-5 in der Zelle durch die Überlebensrate der Zelle bestimmt wird.
- 5 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Aktivität von IGFBP-5 in der Probe durch die Menge des IGFBP-5 Proteins, die Menge der für IGFBP-5 kodierenden Nukleinsäure und/oder die Bindungsaktivität von IGFBP-5 bestimmt wird.
10
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Verringerung der Aktivität von IGFBP-5 in der Probe nach Inkontaktbringen mit mindestens einem potentiellen Wirkstoff darauf hinweist, dass der potentielle Wirkstoff ein pharmakologisch aktiver Wirkstoff ist, welcher die Funktion von Nervenzellen beeinflusse.
15
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei in einem weiteren Schritt der pharmakologisch aktive Wirkstoff isoliert wird.
20
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei in einem weiteren Schritt der pharmakologische Wirkstoff, gegebenenfalls mit geeigneten Hilfs- und Zusatzstoffen, als Arzneimittel formuliert wird.
25
10. Testsystem zum Auffinden pharmakologisch aktiver Wirkstoffe, welche die Funktion von Zellen des Nervensystems beeinflussen, enthaltend:
30
 - a) mindestens eine Probe enthaltend IGFBP-5 oder einen aktiven Teil davon und
 - b) mindestens ein Mittel zur Bestimmung der Aktivität von IGFBP-5 in der Probe.
- 35 11. Verwendung mindestens eines Wirkstoffs zur Prophylaxe und/oder Therapie von Erkrankungen, die mit

Zellwachstumsstörungen von Nervenzellen einhergehen, dadurch gekennzeichnet, das der Wirkstoff in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 aufgefunden wird.

5 12. Verwendung mindestens einer Wirksubstanz zur Prophylaxe und/oder Therapie diabetogener Neuropathie, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirksubstanz die Aktivität von IGFBP-5 reduziert oder hemmt, vorzugsweise spezifisch reduziert oder hemmt.

10

13. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch charakterisiert, dass die Wirksubstanz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "IGF-1, IGF-2, eine Mutante von IGF-1 und/oder IGF-2 mit erhöhter Bindungsaaffinität zu IGFBP-5, ein aktives 15 Fragment von IGF-1 und/oder IGF-2, eine Substanz, welche an die Heparin-bindende Domäne des IGFBP-5 bindet, eine Substanz, welche die Expression und/oder Freisetzung von IGF-1 und/oder IGF-2 stimuliert, eine Nukleotidsequenz, die für IGF-1 und/oder IGF-2 kodiert, eine Nukleotidsequenz, die für eine Mutante von IGF-1 und/oder eine Mutante von IGF-2 mit erhöhter Bindungsaaffinität zu IGFBP5 kodiert, eine Nukleotidsequenz, die für ein aktives Fragment von IGF-1 und/oder ein aktives Fragment von IGF-2 kodiert, eine IGFBP-5 anti-sense Nukleotidsequenz, ein IGFBP-5 20 schneidendes Ribozym, eine IGFBP-5 inhibitorische RNA, und eine Nukleotidsequenz, die für einen IGFBP-5 bindenden Antikörper oder Antikörperfragment kodiert".

25 14. Verwendung einer Wirksubstanz, welche die Expression und/o-
30 der Freisetzung von IGF-1 und/oder IGF-2 stimuliert nach
Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirksubstanz
ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "ein Antipro-
gestin, ein Antioestrogen, das osteogene Protein-1 (OP-1),
das bone morphogenic Protein-2 (BMP-2), der basische Fi-
35 broblast growth factor (bFGF), der transforming growth
factor β-1 (TGSβ-1), der platelet derived growth factor BB

(PDGFBB), ein Interleukin-1 Rezeptor Antagonist, ein Antagonist des Retinsäure-alpha-Rezeptors, und ein Inhibitor des Prostaglandins-2".

5

10

15

20

25

30

35

JC1 Rec'd PCT/PTO 27 APR 2005

SEQUENCE LISTING

<110> MedInnova Gesellschaft für medizinische Innovationen aus akademischer Forschung mbH

Sendtner, Michael Anton
GunnerSEN, Jennifer
Sedlacek, Hans-Harald
Wiese, Stefan

<120> Verfahren zum Auffinden von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen, die die Funktion von Nervenzellen beeinflussen

<130> MED/PCT/0233

<150> DE 10153335.7-41

<151> 2001-10-29

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<400> 1

gccccgaggt aaagccagac t

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<400> 2

ggataggggg aggaagggag g

21

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial

<400> 3

tgcgcaggctg cgtcaggag

19

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<400> 4

cttgcaggta gagcagggtgc tctc

24

<210> 5
<211> 19
<212> DNA
<213> artficial

<400> 5
ctttcgtgca ctgtgaacc

19

<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> artficial

<400> 6
ctcaacgtta ctgctgtcg

19

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> artficial

<400> 7
gtcggccgcc ctaggcacca g

21

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> artficial

<400> 8
ctctttaatg tcacgcacga tttc

24